

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
21 décembre 2000 (21.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/77249 A1J1017 U.S. PTO
10/092885
03/06/02(51) Classification internationale des brevets⁷: C12Q 1/68,
C12N 15/10(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01617(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international: 9 juin 2000 (09.06.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07357 10 juin 1999 (10.06.1999) FR(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (C.N.R.S.) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*):
ARNOULD, Isabelle [FR/FR]; 112, rue de Bry, F-94430
Chennevières-sur-Marne (FR). AUFFRAY, Charles
[FR/FR]; 6, rue du Clos Bourgoin, F-94370 Sucy-en-Brie
(FR). DECRAENE, Charles [FR/FR]; 2, Allée Sully,
F-91170 Viry Châtillon (FR). PIETU, Geneviève
[FR/FR]; 13, rue Albert Leduc, F-77310 Pontthierry (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING COMPLEX MIXTURES OF cDNA AND USES OF SAID MIXTURES FOR GENE
EXPRESSION ANALYSISA1 (54) Titre: METHODE DE PRODUCTION DE MELANGES COMPLEXES D'ADNc ET APPLICATIONS DE CES MELANGES
POUR L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENESWO 00/77249 A1 (57) Abstract: The invention concerns a method for producing a complex mixture of cDNA by reverse transcription of mRNA of
tissues or cells, by adding in the mRNA reaction mixture, elongation terminators, recuperating the resulting cDNA mixture, then
advantageously purifying same. The invention also concerns the use of the complex cDNA mixture, in particular, as hybridisation
probes, particularly for determining the level of gene expression in a sample.(57) Abrégé: Conformément à l'invention, on produit un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse d'ARNm de tissus
ou de cellules, en ajoutant dans le mélange réactionnel d'ARNm, des terminateurs d'élongation, en récupérant le mélange d'ADNc
formé, puis avantageusement en le purifiant. Application du mélange complexe d'ADNc, notamment, comme sondes d'hybridation,
en particulier pour déterminer le niveau d'expression de gènes dans un échantillon.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

**METHODE DE PRODUCTION DE MELANGES COMPLEXES D'ADNc ET
APPLICATIONS DE CES MELANGES POUR L'ANALYSE DE L'EXPRESSION
DES GENES**

5

L'invention a pour objet une méthode pour la production de mélanges complexes d'ADNc et les applications de tels mélanges en particulier, comme
10 sondes pour l'étude des profils d'expression de gènes dans un tissu ou des cellules d'origine animale, végétale et microbienne.

Les méthodes développées pour collecter les
15 profils d'expression d'un grand nombre de gènes sont basées sur l'hybridation de sondes complexes d'ADNc dérivés d'ARN messagers (ARNm) sur différents supports portant soit des clones d'ADNc, soit des oligonucléotides spécifiques de milliers de gènes.

20

L'obtention des ADNc par transcription inverse (en abrégé RT, pour Reverse Transcription) des ARNm comprend classiquement l'utilisation comme amorces soit d'oligo (dT), soit d'oligonucléotides synthétisés de
25 façon aléatoire, soit des oligonucléotides spécifiques des gènes étudiés. Dans le premier cas, l'amorce oligo(dT) se fixe sur la queue poly(A) des ARNm (caractéristiques de l'extrémité 3'OH des ARN messagers

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

2

eucaryotes) et la transcriptase inverse allonge l'amorce oligo(dT) en direction de l'extrémité 5'P des ARNm. Dans le second cas, la fixation de l'amorce, constituée d'oligonucléotides synthétisés au hasard, se fait de façon aléatoire sur toute la longueur de l'ARNm et l'élongation de l'ADNc se fait dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Dans le 3ème cas, la fixation se fait spécifiquement sur les gènes étudiés et l'élongation se fait comme décrit précédemment.

En utilisant ces ADNc comme sondes, il s'agit d'obtenir simultanément plusieurs milliers de signaux d'hybridation qui reflètent des situations biologiques et leurs variations dynamiques pour des études de physiologie, pathologie, ou pharmacologie, mais aussi pour des études comparatives de différents organismes modèles.

On mesurera que la fiabilité de telles études dépend de la nature du mélange d'ADNc produit qui doit refléter la complexité de la population d'ARNm quel que soit le niveau d'abondance des espèces moléculaires qui la constitue.

Or la technique évoquée ci-dessus, qui est la plus couramment utilisée dans les laboratoires, et les kits commercialisés pour synthétiser les ADNc selon les deux types de réaction indiqués plus haut, ne permettent pas une transcription satisfaisante de l'ensemble d'une population d'ARNm, en particulier des ARNm faiblement représentés.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

3

Dans la technique classique de transcription inverse, chaque molécule de transcriptase inverse amorce la synthèse d'une chaîne complémentaire d'un ARNm, puis
5 s'arrête spontanément après l'élongation de quelques centaines de nucléotides, et se détache de la chaîne en cours de synthèse. Elle s'attache alors à une autre chaîne en cours de synthèse dont elle poursuit l'élongation. Ceci a pour effet de favoriser les ARNm les
10 plus abondants dans l'échantillon de départ.

Les inventeurs ont constaté que cette technique pouvait être perfectionnée en contrôlant la transcription.

15 L'invention a donc pour but de fournir une méthode de production de mélanges d'ADNc de grande fiabilité et reproductibilité.

Elle vise également ces mélanges en tant que tels et leurs applications notamment comme sondes
20 d'hybridation.

La méthode selon l'invention, pour la production d'un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse d'ARNm de tissus ou de cellules, est caractérisée
25 par l'addition dans le mélange réactionnel de terminateurs d'élongation, la récupération du mélange d'ADNc formé, suivie avantageusement de sa purification.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

4

De manière surprenante, l'addition des terminateurs d'élongation a pour effet d'empêcher le réamorçage évoqué ci-dessus, les molécules de transcriptase inverse amorçant alors la synthèse des chaînes complémentaires des molécules d'ARNm faiblement représentées (les moins abondantes). Il s'ensuit que les mélanges complexes d'ADNc réalisés en présence des terminateurs d'élongation représentent l'ensemble des ARNm de départ, y compris les ARNm présents en faible quantité.

L'ARNm mis en oeuvre dans la méthode de l'invention provient de cellules en culture ou de prélèvements ou encore de tissu, et peut être d'origine quelconque, animale, végétale ou microbienne.

Un terminateur d'élongation largement utilisé est constitué par les didéoxynucléotides.

La réaction de transcription inverse est en particulier réalisée selon les techniques habituelles.

Comme amorces d'élongation, on utilisera avec avantage des oligonucléotides de synthèse tels que mis en oeuvre classiquement dans les techniques de RT. Des oligonucléotides convenant pour la mise en oeuvre de la méthode de l'invention comprennent des hexamères ou des oligonucléotides synthétisés au hasard. Des moyens de marquage sont avantageusement ajoutés au milieu réactionnel, par exemple des éléments radioactifs, des

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

5

agents fluorescents, luminescents ou colorimétriques, ce qui permet de disposer d'ADNc marqués pour les applications ultérieures.

5 De manière générale, la méthode selon l'invention est applicable à toutes les productions d'ADNc par RT à partir d'ARNm d'un tissu ou d'une cellule, quelle que soit l'origine.

10 Elle présente l'intérêt d'être hautement reproductible, fiable, efficace, et de ne pas engendrer de surcoût notable. Le rendement de la réaction de transcription peut s'élever jusqu'à 90 % et même dépasser cette valeur, alors qu'il n'atteint généralement
15 qu'environ 30 % en opérant selon les conditions habituelles.

Comme illustré dans les exemples, cette méthode présente l'avantage de permettre l'étude d'un très grand
20 nombre de gènes et de leurs niveaux d'expression, quel que soit l'espèce ou le tissu étudié, grâce à la mise en évidence des gènes faiblement exprimés.

Il est alors possible de déterminer avec une
25 grande fiabilité les niveaux d'expression des gènes par comptage des ADNc clonés et séquencés, par exemple selon la méthode SAGE ou le séquençage partiel de banques d'ADNc.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

6

L'invention vise également des kits pour la mise en oeuvre de la susdite méthode aux fins de synthèse de tels mélanges d'ADNc. Ces kits sont caractérisés en ce qu'ils renferment en plus des réactifs pour la réalisation d'une transcription inverse, des terminateurs d'élongation, en particulier des didéoxynucléotides, et une notice d'utilisation.

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les mélanges d'ADNc complexes tels qu'obtenus par la méthode définie ci-dessus et le cas échéant en utilisant lesdits kits.

Ces mélanges sont caractérisés en ce qu'ils reflètent de manière fiable l'état transcriptionnel d'un tissu ou de cellules, à savoir le nombre et le niveau d'expression des gènes.

De tels mélanges constituent donc des copies de transcriptomes de grande qualité et permettent ainsi d'améliorer, dans les expériences d'hybridation, les performances des sondes d'ADNc complexes élaborées à partir de tels mélanges.

L'invention vise donc également l'utilisation des mélanges complexes d'ADNc comme sondes d'hybridation.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

7

De manière avantageuse, ces sondes permettent de mettre en évidence l'expression d'un grand nombre de gènes en améliorant considérablement la capacité de détection de l'activité des gènes faiblement exprimés.

5

La qualité des ADNc du mélange complexe en tant que sondes a été testée en synthétisant des sondes complexes à partir d'ARN messagers de divers tissus.

10

En utilisant des filtres à haute densité permettant l'étude de l'hybridation, simultanément, d'un grand nombre de clones, les inventeurs ont ainsi mis en évidence que les mélanges complexes selon l'invention permettaient de détecter sur les filtres un nombre de clones supérieur de 50 à 150 % à celui observé avec les mélanges d'ADNc utilisés jusqu'alors, la majorité des clones ainsi identifiés étant des clones correspondant à des gènes faiblement exprimés.

15

20

L'invention vise donc également une méthode pour étudier le profil d'expression de gènes dans un tissu ou des cellules.

25

Cette méthode comprend la mise en contact des mélanges d'ADNc marqués définis ci-dessus avec l'ADN à étudier (ADNc, ou oligonucléotides spécifiques des ADN), dans des conditions permettant l'hybridation des séquences complémentaires lorsqu'elles sont présentes.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

8

On opère dans des conditions stringentes ou non avec des supports sur lesquels sont déposés les ADN à étudier.

5

Ces supports peuvent être des filtres Nylon®, mais aussi d'autres supports, dont des lames de verre.

10

Des conditions appropriées correspondent à l'utilisation d'une température de 68°C pendant 2 heures avec la même solution avec 20×10^6 cpm de sonde.

On procède à un lavage des filtres, puis on révèle les hybrides formés.

15

L'invention fournit ainsi des moyens pour étudier l'expression des gènes et les modulations de cette expression en fonction de certains facteurs.

20

Elle permet ainsi d'identifier des cibles au niveau thérapeutique pour développer des médicaments.

25

On citera à titre d'exemples, des applications en cancérologie, principalement dans les cancers du colon, pour identifier les gènes modifiés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines et déterminer des cibles potentielles pour des développements thérapeutiques ; dans les maladies neuromusculaires pour des identifications du type sus-

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

9

indiqué au niveau du muscle, par exemple dans la myopathie de Duchesne (DMD) ; pour effectuer des études sur les muscles en état d'apesanteur, ou encore dans des maladies neurodégénératives (Maladie de Parkinson ou
5 Amyotrophie latérale sclérosante (ALS)).

D'autres applications chez les bovins et les caprins ont pour but d'étudier les gènes modifiés dans la glande mammaire durant la gestation et la lactation, afin de
10 connaître les cibles permettant d'améliorer la qualité et la quantité de lait.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 et 2, qui représentent respectivement, selon les 4 conditions d'amorçage de RT,
15

- la figure 1, le rapport entre la taille des inserts en kb et les intensités d'hybridation,
20

- la figure 2A, l'hybridation de filtres à haute densité avec des sondes complexes d'ADNc dérivées d'ARNm poly (A)⁺ de muscle squelettique de souris, et
25

- la figure 2B, la distribution des clones par classe d'hybridation.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

10

Exemple 1 : Production d'un mélange complexe d'ADNc à partir d'ARNm de muscle squelettique de souris.

On rapporte les résultats de 5 séries
5 d'expériences.

On synthétise à chaque fois un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse de 500 ng d'ARNm poly(A)⁺ de muscle squelettique de souris. On effectue la
10 réaction à l'aide du système de pré-amplification SuperScript[®] pour la synthèse du premier brin d'ADNc (Life Technologies SARL, Cergy Pontoise, France), en opérant selon les recommandations du fabricant. On utilise 500 ng d'hexamères ou 500 ng d'amorces oligo(dT),
15 50 µCi de [α-³³P]dATP, 3000 Ci/mmele (Amersham France, S.A., Les Ulis, France) et 500 µM de d(T, C, G)TP (Pharmacia Biotech, Orsay, France) dans un volume final de 50 µl.

20 On purifie le mélange complexe obtenu sur une colonne de Séphadex G-50[®] (Quick Spin[®], Boehringer Mannheim, France S.A., Meylan, France).

25 On détermine la quantité de radioactivité avant et après purification à l'aide d'un compteur de scintillation (Beckman instruments France S.A., Gagny, France) pour calculer l'activité spécifique du mélange complexe d'ADNc (cpm/µg d'ADNc) et le rendement de la

PCT/FR00/01617

11

5

10

15

AS	Rendement	AS	Rendement	AS	Rendement	AS	Rendement
$3,10^9$	44	$6,10^9$	28	$5,10^9$	1	$5,10^9$	100
$3,10^9$	15	$6,10^9$	31	$5,10^9$	21	$3,10^9$	100
$2,10^9$	17	$5,10^9$	38	$5,10^9$	19	$5,10^9$	95
$4,10^9$	42	$5,10^9$	39	$3,10^9$	24	$5,10^9$	89
$4,10^9$	89	$5,10^9$	39	$3,10^9$	9	$5,10^9$	79

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

12

"*"correspond aux sondes utilisées pour les hybridations de filtres représentées sur la figure 2.

L'examen de ce tableau montre que l'activité
5 spécifique des mélanges d'ADNc complexes se situe dans
l'intervalle de 2 à 6×10^9 cpm/ μ g indépendamment des
conditions de l'amorçage RT. En utilisant des amorces
oligo(dT) ou des hexamères, le rendement de la réaction
RT qui se situe, respectivement, de 15 à 89% et de 1 à
10 24%, apparaît très variable.

Au contraire, en présence de
didéoxynucléotides, le rendement moyen de la réaction,
égal à environ 35% en utilisant des oligo(dT) et à
15 environ 95% en utilisant des hexamères apparaît beaucoup
plus reproductible.

Les données de ce tableau montrent en outre que
l'incorporation de didéoxynucléotides dans le mélange
20 réactionnel améliore l'efficacité de la synthèse d'ADNc
amorcée avec les hexamères par un facteur de 5 en moyenne
avec toutes les valeurs supérieures à 79%. Des résultats
similaires sont obtenus en opérant avec 50 et 5 μ M de
ddTTP (à savoir 1/10 ou 1/100 de concentration en dNTP)
25 et avec ddCTP à la place de ddTTP.

Exemple 2 : Utilisation du mélange complexe
d'ADNc de l'exemple 1 comme sonde.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

13

On utilise le mélange complexe d'ADNc purifié aux fins d'hybridation sur des filtres de Nylon® à haute densité (Hybond-N+, Amersham France S.A., France), comportant les produits d'amplification PCR des inserts
5 de 1339 clones d'ADN à partir d'une banque de muscle squelettique humain.

Les filtres sont pré-hybridés à 68°C pendant 30 minutes dans une solution d'hybridation ExpressHyb®
10 (Clontech Inc., Palo Alto, CA, EUA). On procède à l'hybridation à 68°C pendant 2 heures dans la même solution avec 20×10^6 cpm de sonde. On lave les filtres à température ambiante à deux reprises pendant 30 minutes dans SSC 1X/0,1% de SDS, et à deux reprises pendant 30
15 minutes dans SSC 0,1X/0,1% de SDS.

Ces conditions non stringentes permettent une hybridation optimale entre les sondes d'ADNc de souris et les cibles d'ADNc humains. Les filtres sont ensuite
20 exposés à des écrans de phosphore pendant 16 heures (Molecular Dynamics S.A., Paris, France).

Pour chaque filtre, on identifie et on quantifie les 1339 signaux d'hybridation à l'aide d'un
25 logiciel spécialement conçu pour cette application (XdotReader, Cose, France). Pour chaque clone, la valeur de l'intensité de l'hybridation est calculée comme décrit dans Piétu et al, Genome Research, 1996, 6:492-503, et

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

14

normalisée par division par la moyenne de toute les valeurs d'intensité sur chaque filtre.

L'utilisation d'hexamères et/ou de didéoxynucléotides dans la réaction RT n'introduit pas de déviation dans l'hybridation des inserts d'ADNc de différentes longueurs, comme le montre l'absence de corrélation globale entre l'intensité des signaux et la longueur des inserts d'ADNc ($r \leq 0,05$ avec les quatre conditions d'amorçage testées, rapportées dans la figure 1).

La figure 2A illustre les aspects qualitatifs de l'hybridation de filtres à densité élevée avec les sondes d'ADNc complexes obtenues dans chaque condition testée.





L'analyse des signaux d'hybridation permet d'assigner des valeurs d'intensités aux 539 (40%), 451 (33%), 797 (60%) et 1122 (83%) clones, qui diffèrent du bruit de fond lorsque la sonde est amorcée avec, respectivement, des oligo(dT), des hexamères, des oligo(dT) + ddTTP et des hexamères + ddTTP.

Ces résultats montrent une augmentation globale des clones détectés en présence de didéoxynucléotides : + 47% et +148% en utilisant respectivement des amorces oligo(dT) ou des hexamères.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

15

La figure 2B illustre l'analyse quantitative des valeurs d'intensité d'hybridation distribuées dans 4 catégories représentatives : bruit de fond (B), faible (f), moyen (M) : 2 fois la valeur faible, et forte (F) : 5 6 fois la valeur faible. Les significations des symboles utilisés sont les suivantes : amorces oligo (dT) : , hexamères : , amorces oligo (dT) + ddTTP : , et hexamères + ddTTP : . Le nombre de clones de chaque classe d'intensité d'hybridation est reporté en haut de 10 chaque histogramme.

Le nombre de clones avec des valeurs d'intensités d'hybridation fortes ou moyennes montre des variations limitées lorsqu'on utilise les quatre 15 conditions RT.

Au contraire, le nombre de clones avec des valeurs d'intensités faibles est plus que doublé lorsqu'on utilise les didéoxynucléotides avec des 20 amorces oligo(dT), et multiplié presque de 18 fois lorsqu'on les utilise avec des hexamères. Dans ces conditions la fraction de clones associée aux signaux d'hybridation qui ne peut être distinguée du bruit de fond avec une fiabilité élevée est limitée à 16%, ce qui 25 illustre la capacité améliorée de la sonde d'ADNc complexe correspondante à refléter les transcrits les moins abondants.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

16

De plus, les valeurs d'intensités d'hybridation obtenues avec une sonde d'ADNc complexe produite avec les hexamères et les didéoxynucléotides dans 4 hybridations du même filtre à densité élevée diffère de -10%.

5

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

17

REVENDEICATIONS

1/ Méthode pour la production d'un mélange complexe d'ADNc par transcription inverse d'ARNm de tissus ou de cellules, caractérisée par l'addition dans
5 le mélange réactionnel d'ARNm, de terminateurs d'élongation, la récupération du mélange d'ADNc formé, suivi avantageusement de sa purification.

2/ Méthode selon la revendication 1, caractérisée par l'utilisation de didéoxynucléotides
10 comme terminateurs d'élongation.

3/ Kits pour la synthèse de mélanges d'ADNc selon la méthode de la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils renferment en plus des réactifs pour la réalisation d'une transcription inverse, des terminateurs
15 d'élongation, en particulier des didéoxynucléotides, et une notice d'utilisation.

4/ Mélanges d'ADNc tels qu'obtenus par mise en oeuvre de la méthode selon la revendication 1 ou 2, reflétant de manière fiable l'état transcriptionnel d'un
20 tissu ou de cellules, à savoir le nombre et le niveau d'expression des gènes.

5/ Utilisation de mélanges complexes d'ADNc selon la revendication 4, comme sondes d'hybridation.

6/ Méthode pour l'étude de profils d'expression
25 de gènes dans un tissu ou des cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en contact des mélanges d'ADNc selon la revendication 4, avec l'ADN à étudier

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

18

(ADNc, ou oligonucléotides spécifiques des ADN), dans des conditions permettant l'hybridation des séquences complémentaires lorsqu'elles sont présentes.

7/ Application de la méthode selon l'une des
5 revendications 1 ou 2 aux productions d'ADNc par
transcription inverse à partir des ARNm d'un tissu ou
d'une cellule, en particulier en vue de déterminer le
niveau d'expression des gènes par le comptage des ADNc
clonés et séquencés, par exemple selon la méthode SAGE ou
10 le séquençage partiel de banques d'ADNc.

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

1/2

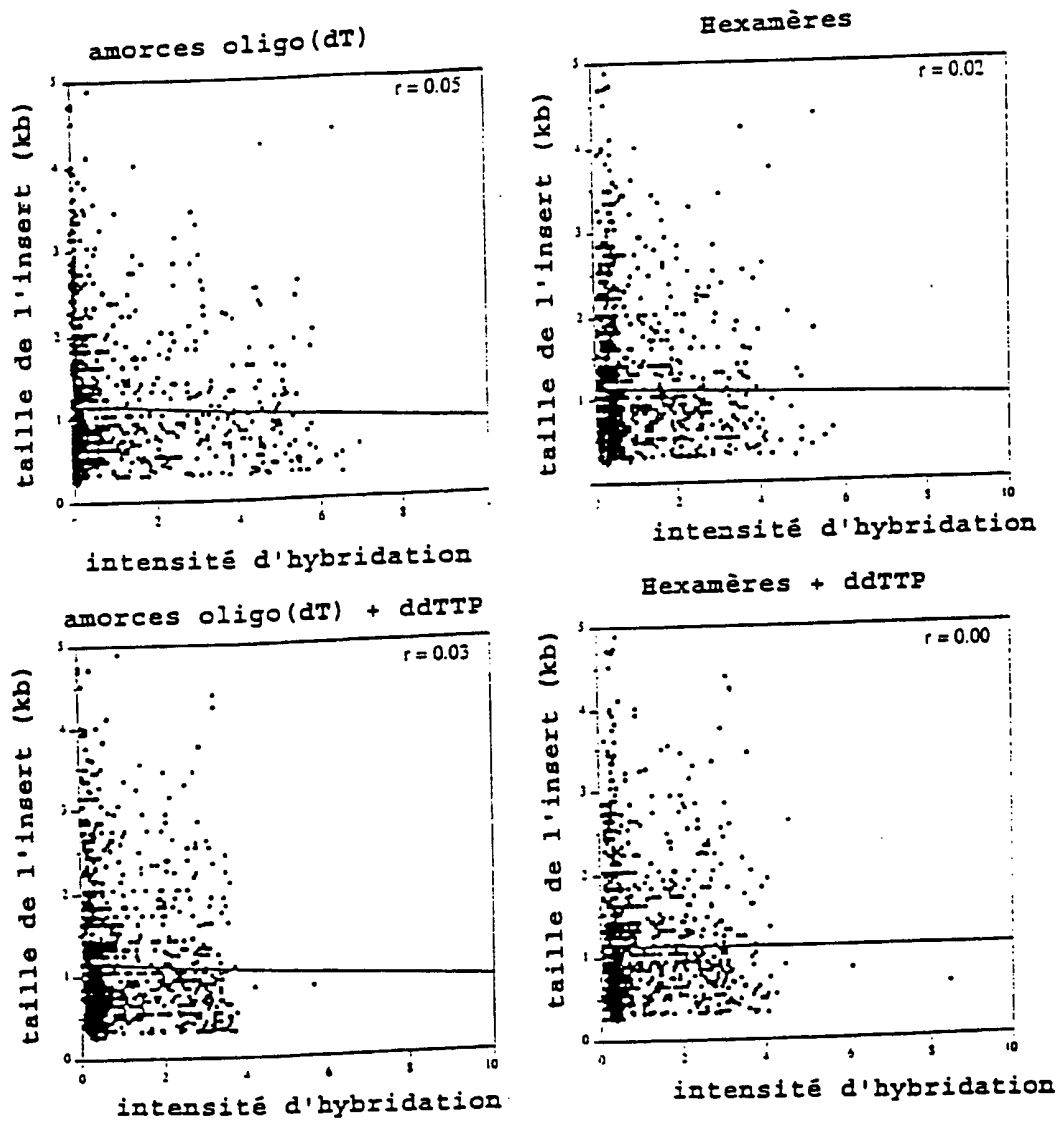


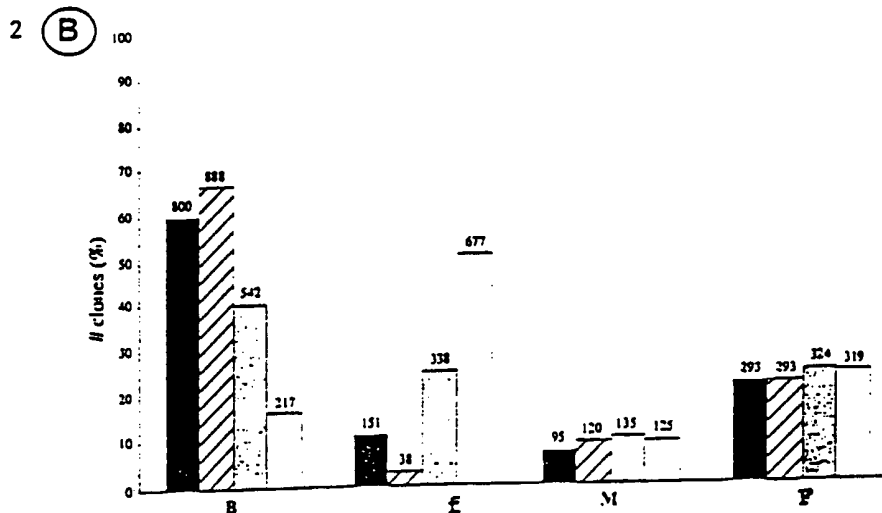
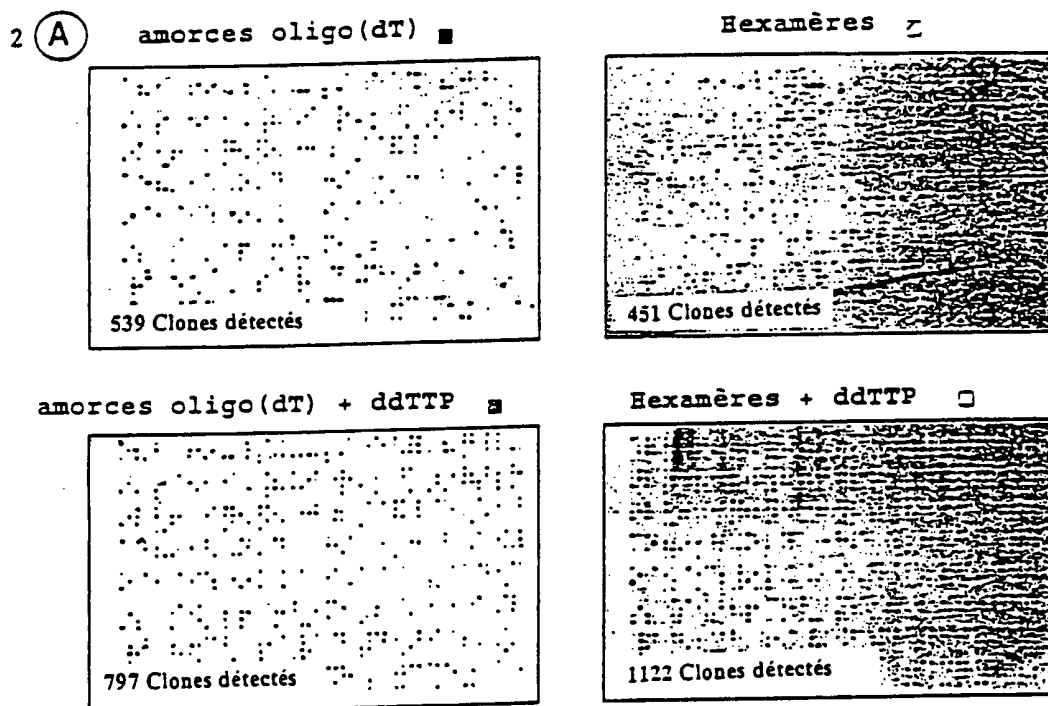
FIGURE 1

WO 00/77249

PCT/FR00/01617

2/2

FIGURE 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01617

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 738 928 A (WEISSMAN SHERMAN M ET AL) 19 April 1988 (1988-04-19) abstract column 2, line 38 - line 43 column 3, line 20 - column 4, line 43; claims 1,11,13; examples 4,5	1-7
X	KOCH G AND KANT A: "Nucleotide and amino acid sequence of the S1 subunit of the spike glycoprotein of avian infectious bronchitis virus, strain D3896" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 10, 1990, pages 3063-3064, XP002134977 abstract	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 November 2000

Date of mailing of the international search report

22/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/01617

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SPIGELMAN Z ET AL.: "2',3'-Dideoxyadenosine is selectively toxic for TdT-positive cells" BLOOD, vol. 71, no. 6, 1988, pages 1601-1608, XP000889667 abstract	1-7
Y	PIETU G ET AL: "NOVEL GENE TRANSCRIPTS PREFERENTIALLY EXPRESSED IN HUMAN MUSCLES REVEALED BY QUANTITATIVE HYBRIDIZATION OF A HIGH DENSITY CDNA ARRAY" GENOME RESEARCH,US,COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, vol. 6, no. 6, 1 June 1996 (1996-06-01), pages 492-503, XP000597086 ISSN: 1088-9051 the whole document	1-6
Y	VELCULESCU V E ET AL: "SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 270, 20 October 1995 (1995-10-20), pages 484-487, XP002053721 ISSN: 0036-8075 the whole document	1,7
P,X	DECRAENE C ET AL.: "Reverse transcription in the presence of dideoxynucleotides to increase the sensitivity of expression monitoring with cDNA arrays" BIOTECHNIQUES, vol. 27, 1999, pages 962-966, XP000884955 the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01617

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4738928 A	19-04-1988	US 4394443 A	19-07-1983
		AU 8007182 A	01-07-1982
		EP 0067213 A	22-12-1982
		WO 8202060 A	24-06-1982

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No

PCT/FR 00/01617

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12Q1/68 C12N15/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 4 738 928 A (WEISSMAN SHERMAN M ET AL) 19 avril 1988 (1988-04-19) abrégé colonne 2, ligne 38 - ligne 43 colonne 3, ligne 20 - colonne 4, ligne 43; revendications 1,11,13; exemples 4,5	1-7
X	KOCH G AND KANT A: "Nucleotide and amino acid sequence of the S1 subunit of the spike glycoprotein of avian infectious brochitis virus, strain D3896" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 10, 1990, pages 3063-3064, XP002134977 abrégé	1-3



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

14 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/11/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Dem : internationale No
 PCT/FR 00/01617

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SPIGELMAN Z ET AL.: "2',3'-Dideoxyadenosine is selectively toxic for TdT-positive cells" BLOOD, vol. 71, no. 6, 1988, pages 1601-1608, XP000889667 abrégé	1-7
Y	PIETU G ET AL: "NOVEL GENE TRANSCRIPTS PREFERENTIALLY EXPRESSED IN HUMAN MUSCLES REVEALED BY QUANTITATIVE HYBRIDIZATION OF A HIGH DENSITY CDNA ARRAY" GENOME RESEARCH,US,COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, vol. 6, no. 6, 1 juin 1996 (1996-06-01), pages 492-503, XP000597086 ISSN: 1088-9051 le document en entier	1-6
Y	VELCULESCU V E ET AL: "SERIAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION" SCIENCE,US,AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, vol. 270, 20 octobre 1995 (1995-10-20), pages 484-487, XP002053721 ISSN: 0036-8075 le document en entier	1,7
P,X	DECRAENE C ET AL.: "Reverse transcription in the presence of dideoxynucleotides to increase the sensitivity of expression monitoring with cDNA arrays" BIOTECHNIQUES, vol. 27, 1999, pages 962-966, XP000884955 le document en entier	1-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den e internationale No

PCT/FR 00/01617

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4738928 A	19-04-1988	US 4394443 A	19-07-1983
		AU 8007182 A	01-07-1982
		EP 0067213 A	22-12-1982
		WO 8202060 A	24-06-1982